

## 津山市スーパーマーケットにおける食肉ミンチからの カンピロバクターの検出

杉山 芳宏・長嶺 藍

美作大学・美作大学短期大学部紀要（通巻第53号抜刷）

論 文

## 津山市スーパーマーケットにおける食肉ミンチからの カンピロバクターの検出

An investigation of *Campylobacter* from minced meats marketing in Tsuyama city

杉山 芳宏、長嶺 藍

キーワード：カンピロバクター、ミンチ肉、スーパーマーケット、交差汚染

### はじめに

カンピロバクター属菌は、約 100 年前から家畜の流産菌 *Campylobacter fetus* (*C. fetus*) が知られていたが、1977 年に Skirrow M.B.<sup>1)</sup> および 1979 年 Butzler J.P. ら<sup>2)</sup> によって、新たなカンピロバクター腸炎菌が発見された。現在では、カンピロバクター属菌では、ヒトの腸炎起因菌は *Campylobacter jejuni* / *coli* (*C. jejuni/coli*) を代表とし、*C. lari*, *C. hyointestinalis*, *C. upsaliensis* などがある。*C. jejuni/coli* は、1982 年に我国でも食中毒細菌に指定され、近年でも細菌性食中毒の中で発生件数、患者数ともに多く、最も注意を要する食中毒細菌の 1 つである。さらに、*C. jejuni/coli* の感染症に併発することがあるギランバレー症候群やミラーフィッシャー症候群などの神経麻痺症状との病的関連が注目されている<sup>3, 4)</sup>。

*C. jejuni/coli* のヒトへの感染は、主に鳥肉を介する感染が重要視される。ニワトリは保菌率が高く、鶏肉の汚染率は、豚、牛肉と比べても非常に高いことが知られている。また、カンピロバクターは、微好気性で増殖に 25℃ 以上の温度を必要とする。すなわち、市販肉での通常の管理、加工では、本菌は増殖しないことから、原材料の汚染と加工の過程での汚染に限定される。そこで、ミンチ肉のように、加工の過程での汚染も視野に入れ、我々は、岡山県津山市内のスーパー

マーケットにおける食肉ミンチからのカンピロバクターの検出を試み、近年の汚染実態の調査を行った。

### 材料と方法

市販畜肉：岡山県津山市内スーパーマーケット 5 店舗で市販された牛肉、豚肉および鶏肉のミンチを 2007 年 6 月から 7 月に 5 回購入し、各食肉ミンチ合計鶏肉 25 例、豚肉 26 例および牛肉 23 例の検査材料を得た。

増菌・分離培養：カンピロバクターの増菌分離用に知られるバツラーの添加剤（ニッスイ）を、また、微好気培養には、嫌気ジャーにカンピロバクター培養用ガスパック（三菱ガス化学）を使用した。増菌培地は、5 % 馬脱繊維血添加ブレインハートインヒュージョンブイヨン（栄研）25ml を用い、これにミンチ肉 1 g を加え、42℃、48 時間培養した。分離培養は、増菌液を 5 % 馬脱繊維血添加ブレインハートインヒュージョン寒天培地に塗抹して、42℃、48 時間培養した。培養後、寒天培地上の半透明のカンピロバクター様コロニーを釣菌して、添加剤を含まない 5 % 馬脱繊維血添加ブレインハートインヒュージョン寒天培地に純培養を行った。

同定検査：常法<sup>5)</sup> に従い、抗生物質感受性検査（セファロシン、ナリジクス酸）および馬尿酸分解試験（ニンヒドリン試験）、25℃ 増殖性試験、微好気性試験、

カタラーゼ試験および顕微鏡観察を行った。また、市販抗血清（デンカ生検）を用いた受身凝集反応（Penner 法）による血清型別を実施した。

PCR によるカンピロバクター鞭毛遺伝子（flaA）の確認：De Boer ら<sup>6)</sup> の使用した flA 遺伝子用プライマーを参考とし、95℃、60 秒、60℃、30 秒、72℃、30 秒の 40 サイクルの PCR 増幅を行った。使用試薬は、2.5U Taq DNA ポリメラーゼ（ジェネティクス）、×10PCR バッファー、200nMdNTPs、2mMMgCl<sub>2</sub>、および 2 μM のプライマー（北海道サイエンス）を用いた。遺伝子の抽出は、熱抽出法を用い、1 白金耳の菌を 100 μl の滅菌蒸留水に懸濁し、沸騰水中に 10 分間置き、直ちに冷却遠心（10,000rpm、5 分間）して、上清を使用した。増幅 DNA は、臭化エチジウム添加 2% アガロース電気泳動を行い、紫外線下での増幅 DNA の確認を行った。

## 結果と考察

表 1 に示される通り、鶏肉および豚肉ミンチから 32 株のカンピロバクター菌株が分離された。各菌株の生物化学性状は、表 1 の通りである。32 菌株中 *C.jejuni* 16 株、*C.coli* 7 株、および *C.lari* 9 株と同定され、*C.jejuni/coli* の比率は 71.9% であった。本調査では、カンピロバクターの選択性は高いが、検出感度は低いバツラーの選択剤を利用したこともあり、表 2 に示される通り、鶏ミンチ肉からの検出率は、25 検体中 11 検体（44%）であった。また、今回の調査結果では、豚ミンチ肉 26 検体中 1 検体（3.8%）からも本菌が分離された。カンピロバクターの感染源として重要視されているのがニワトリであり、鶏肉の汚染率は他の畜肉に比べて非常に高く、75% という報告がある<sup>4)</sup>。また我々の調査と同様に、希な調査報告ではあるが、群馬県で市販される鶏肉ミンチを検査した報告がある<sup>7)</sup>。その報告によると、市販される鶏肉ミンチにおけるカンピロバクターの検出率は 20% であり、ひき肉処理されると検出率が低下することが推測される。我々の結果も、市販鶏ミンチ肉からは、検出率

44% を確認したが、ひき肉処理されない鶏肉の高度な汚染には及ばない。しかし、岡山県津山地域で市販される鶏肉ミンチでも、報告される程度以上のカンピロバクター汚染が確認された。

加えて、森田ら<sup>8)</sup> の報告によると、牛や豚の盲腸内容物からは高率にカンピロバクターが検出されるのに対し、市販される豚や牛肉ミンチ 50 サンプルからは、カンピロバクターは検出されなかった。すなわち、

表 1 分離されたカンピロバクター菌株一覧

菌株 No.	検査日 *	店舗	由来	ラセン 形態	25℃	42℃	CO <sub>2</sub>	CE	NA	馬尿酸	PCR	カタラーゼ	血清型
1	6/4	D	鶏	+	-	+	+	耐	感	+	+	+	ND
2	6/4	D	鶏	+	-	+	+	耐	感	+	+	+	ND
3	6/4	D	鶏	+	-	+	+	耐	感	+	+	+	ND
4	6/4	D	鶏	+	-	+	+	耐	感	+	+	+	ND
5	6/11	A	豚	+	-	+	+	耐	感	+	+	+	G
6	6/11	A	豚	+	-	+	+	耐	感	-	+	+	ND
7	6/11	A	鶏	+	-	+	+	耐	感	+	+	+	G
8	6/11	A	鶏	+	-	+	+	耐	感	+	+	+	G
9	6/11	D	鶏	+	-	+	+	耐	感	+	+	+	B
10	6/11	D	鶏	+	-	+	+	耐	感	+	+	+	N
11	6/11	D	鶏	+	-	+	+	耐	感	+	+	+	J
12	6/11	E	鶏	+	-	+	+	耐	耐	-	+	+	ND
13	6/11	E	鶏	+	-	+	+	耐	耐	-	+	+	ND
14	6/11	E	鶏	+	-	+	+	耐	耐	-	+	+	ND
15	6/18	D	鶏	+	-	+	+	耐	感	+	+	+	B
16	6/18	D	鶏	+	-	+	+	耐	感	-	+	+	J
17	6/18	D	鶏	+	-	+	+	耐	感	+	+	7	ND
18	6/18	D	鶏	+	-	+	+	耐	感	-	+	+	ND
19	6/25	A	鶏	+	-	+	+	耐	感	-	+	+	ND
20	6/25	A	鶏	+	-	+	+	耐	感	-	+	+	ND
21	6/25	D	鶏	+	-	+	+	耐	感	+	+	+	ND
22	6/25	D	鶏	+	-	+	+	耐	感	+	+	+	F
23	6/25	D	鶏	+	-	+	+	耐	感	+	+	+	N
24	6/25	E	鶏	+	-	+	+	耐	耐	-	+	+	ND
25	6/25	E	鶏	+	-	+	+	耐	耐	-	+	+	ND
26	6/25	E	鶏	+	-	+	+	耐	耐	-	+	+	ND
27	7/2	A	鶏	+	-	+	+	耐	耐	-	+	+	ND
28	7/2	A	鶏	+	-	+	+	耐	耐	-	+	+	ND
29	7/2	B	鶏	+	-	+	+	耐	感	+	+	7	ND
30	7/2	D	鶏	+	-	+	+	耐	感	-	+	+	ND
31	7/2	D	鶏	+	-	+	+	耐	感	-	+	+	ND
32	7/2	D	鶏	+	-	+	+	耐	感	-	+	+	B

32 分離株は以下のように同定された

*C.jejuni* 16 株（菌株 No.1-5,7-11,15,17,21-23,29）

*C.coli* 7 株（菌株 No.16,18-20,30-32）

*C.lari* 9 株（菌株 No.6,12-14,24-28）

\* 検査日はすべて 2007 年である

表2 店舗毎・畜種毎のカンピロバクター検出状況

店舗	カンピロバクター検出ミンチの畜種						店舗毎検出割合
	検査日*3	6/4	6/11	6/8	6/25	7/2	
A			鶏・豚*1		鶏	鶏	鶏 3/5, 豚 1/5*1
B					鶏	鶏	鶏 1/5
C						鶏	鶏 0/5
D		鶏	鶏	鶏	鶏	鶏	鶏 5/5*2
E			鶏		鶏	鶏	鶏 2/5

畜種毎検出割合：鶏 11/25、豚 1/26、牛 0/23

\*1 A店の1例のみ豚肉ミンチよりカンピロバクターが検出された

\*2 D店のカンピロバクター検出率は100%である

\*3 検査日はすべて2007年である

家畜として豚や牛においては、本菌の汚染は見られるが、ひき肉において汚染は認められず、精肉工程での汚染は防げていると推測される。しかし、鶏肉では生肉処理場内での処理でも容易に交差汚染が発生し、汚染は広がるとも考えられる。本結果でも、個々のパックの鶏肉ミンチから検出されたカンピロバクターは、複数の血清型、異なる菌種の交差汚染が認められた。鶏肉ミンチは、複数の鶏個体由来の肉が混ざっており、個々の汚染も精肉処理工程で持続・保存され、ミンチ肉として混合された結果といえる。すなわち、鶏肉の扱いは、豚や牛肉の精肉処理工程よりも、衛生的な管理が不十分と云える。

また、6月11日検査のA店の豚肉からは同日に検査された鶏肉由来のC. jejuniと同じ血清型Gの株が得られ、カンピロバクターは豚肉からの検出頻度が低いことから、鶏肉処理の工程で、豚肉へのカンピロバクター汚染の移行が示唆される。すなわち、両肉の処理、取扱いの工程上、完全分別されず交差する工程が存在した可能性がある。

さらにニワトリとしてのカンピロバクター汚染は、飼育群によって0%から100%である報告もある<sup>9)</sup>。スーパーで市販されてる鶏肉は、契約納入されているため、飼育場も限定されている可能性が高い。今回調査したD店の鶏肉からはカンピロバクターが100%検出されたが、これは飼育場での汚染である可能性が高い。逆にC店は、今回1例もカンピロバクターが検出されていないことから、鶏のカンピロバクター汚染の

ない飼育場由来の可能性はある。

一方、鶏肉の流通、保管の過程で、冷凍工程が含まれるとカンピロバクターの検出には影響がある。肉の凍結・融解を1回行くと菌数は1/10に減少し、また、-20℃で1週間以上保存された凍結肉からは、菌の検出が困難となることが報告されている<sup>10)</sup>。菌が検出されなかったC店やB店などは、凍結鶏肉がミンチの主体となっている可能性が高い。さらに鶏肉からのカンピロバクター検出では国産と輸入で、違いがあり国産が検出率が高い<sup>11,12)</sup>。検査した市販鶏肉ミンチの表示は、国産である表示はあったが、ブランド鶏肉と異なり、特に産地、繁殖場が明記されていない。今回の検出結果から、検出率の高い店舗ほど、国産鶏肉主体の鶏肉ミンチであることが示唆される。

興味深いことに、D店の6月11日（菌株No.9-11）、6月18日（菌株No.15-18）および7月2日（菌株No.30-32）などは、同一サンプルから複数の血清型、生物型の菌株が検出されている。特にこれら場合は、汚染の主となる菌株がなく、分離される菌株毎に異なる血清型、生物型、種である。これは、鶏肉におけるカンピロバクター汚染の多様性を示しているように思える。今後はさらに、これら菌株のDNAレベルでの検討を加え、DNAの多様性、多形性を示したい。

最後に、我国ではニワトリを含む様々な畜肉を食する習慣があり、特に十分に加熱されない肉、または生肉を食することから、本菌に感染するリスクが高い<sup>13,14)</sup>。津山市で市販される食肉におけるカンピロバクターの汚染が本研究でも確認され、他の畜肉のひき肉処理における汚染の可能性も示唆されたことから、畜肉の加工処理現場においても、交差汚染に対する十分な取扱い注意を喚起したい。

## 参考文献

- 1) Skirrow M.B. Campylobacter enteritis : a "new" disease. Br.Med.J. 2: 9-11, 1977
- 2) Butzler J.P. and Skirrow M.B. Clinics in Gastroenterology (Lambert H.P. ed.) . W.B.Saunders (London) 737, 1979

- 3) 三澤尚明 カンピロバクター感染症の新展開 日本食品微生物学会雑誌 20: 91-97,2003
- 4) 三澤尚明 カンピロバクター感染症 モダンメディア 51: 45-52,2005
- 5) 厚生労働省監修 食品衛生検査指針 微生物編 社団法人日本衛生協会発行 225-235, 2004
- 6) De Boer P. et al: Computer-assisted analysis and epidemiological value of genotyping methods for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. J.Clin. Microbiol. 38: 1940-1946, 2000
- 7) 森田幸雄ら：市販鶏ひき肉における *Arcobacter*, *Campylobacter* および *Salmonella* の汚染状況 日本獣医師会雑誌 56: 401-405, 2003
- 8) 森田幸雄ら：家畜および市販ひき肉における *Arcobacter*, *Campylobacter* および *Salmonella* の分布状況 日本獣医師会雑誌 57: 393-397, 2004
- 9) Miwa N. et al: RAPD PCR type of *Campylobacter* isolates from cecum contents of broiler chickens. Jpn.J.Food. Microbiol. 20: 211-215,2003
- 10) 小野一晃ら：冷凍保存鶏肉における *Campylobacter jejuni* の生存性とパルスフィールド・ゲル電気泳動法による分離菌株の遺伝子解析 日本食品微生物学会雑誌 22: 59-65, 2005
- 11) 小野一晃ら：国産および輸入鶏肉におけるカンピロバクターの汚染状況 日本獣医師会雑誌 56: 103-105, 2003
- 12) 小野一晃ら：二段階増菌による輸入鶏肉からのカンピロバクター分離法の検討 日本食品微生物学会雑誌 24: 130-133, 2007
- 13) 小野一晃ら：バーベキューの鳥肉によるカンピロバクター食中毒 日本食品微生物学会雑誌 20: 83-85, 2003
- 14) 安藤陽子ら：鶏肉が原因と推定されたカンピロバクター食中毒事例 日本食品微生物学会雑誌 23: 27-30, 2006